云 南 植 物 研 究 2010, **32** (2): 147～150
Acta Botanica Yunnanica DOI: 10.3724/SP.J.1143.2010.09204

快速碱化因子基因 *BcRALF* 在菜心中的克隆及序列分析*

李焰焰[1,2], 曹家树[2**]
(1 阜阳师范学院生命科学学院, 安徽 阜阳 236041; 2 浙江大学蔬菜研究所细胞与分子生物学实验室, 浙江 杭州 310029)

摘要: 快速碱化因子是近年来新发现的一种植物多肽类信号分子, 广泛存在于高等植物中。通过已得到的普通白菜的快速碱化因子基因 *BcMF14* (GenBank 序列登录号 EF523516) 的核苷酸序列, 在其编码框两侧设计引物, 从菜心中克隆出该类信号分子基因, 命名为 *BcRALF* (登陆号: GU086228)。序列同源比对表明该基因与花椰菜、拟南芥等的快速碱化因子基因有很高的相似性, 证明 *BcRALF* 属于快速碱化因子家族。蛋白质特征预测以及蛋白序列结构分析发现 BcRALF 蛋白包含有多个生物活性位点, 符合其作为多肽类信号分子类蛋白的特征。

关键词: 菜心; *BcRALF*; 快速碱化因子
中图分类号: S 634.3, Q 785 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2700(2010) 02-147-04

Isolation and Molecular Characterization of RALF-Like Gene *BcRALF* from *Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *parachinensis*

LI Yan-Yan[1,2], CAO Jia-Shu[2**]
(1 *School of Life Sciences, Fuyang Teachers College*, Fuyang 236041, China; 2 *Laboratory of Cell and Molecular Biology, Institute of Vegetable Science, Zhejiang University*, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The rapid alkalinization factor (RALF) gene is a new found plant polypeptide signal molecule, wide spreading in higher plants. In this study *BcRALF* was cloned from *Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino var. *parachinensis* based on *BcMF14* (GenBank accession number EF523516) from *B. campestris* ssp. *chinensis* var. *communis* cv. Aijiaohuang. The sequence of this gene was 273 bp (GU086228) and was identified as a rapid alkalization factor gene according to its high identity with *B. oleracea* var. *botrytis BoRALF1* and *Arabidopsis thaliana RALFL9*. Protein characteristics and sequence structure were predicted, and moreover, many bioactive sites were found. The results showed that the characteristics of the BcRALF protein consistent with its category as a peptide signal molecule.

Key words: *Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *parachinensis*; *BcRALF*; Rapid alkalization factor gene

快速碱化因子 (rapid alkalization factor, RALF) 是植物多肽类信号分子的一种, 是 Pearce 等 (2001) 在对系统素的研究中偶然发现的。多肽信号是重要的胞间信号感应分子 (Franssen and Bisseling, 2001; Ryan and Pearce, 2001; Matsubayashi 等, 2001; Pearce 等, 2001; Ryan and Pearce, 2003; Yang 等, 2000), 它们与植物中非蛋白质类的信号分子 (生长素、赤霉素、细胞分裂素、

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30671426)、浙江省重大科技项目 (2005C12019-02)、安徽省高校青年教师资助项目 (2008jq1121)
** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: jshcao@zju.edu.cn
收稿日期: 2009-10-14, 2009-11-23 接受发表
作者简介: 李焰焰 (1976—) 女, 博士, 副教授, 研究方向: 植物生物技术。E-mail: liyanyan1976@yahoo.com.cn

乙烯、脱落酸、芸薹素、茉莉酸等）共同形成一个信号网络，调节植物的生长发育。作为多肽信号分子中的一大类别，快速碱化因子广泛存在于植物中。被证明在植物多个器官的不同发育时期都表达。花粉发育在植物生殖发育过程中是一个研究热点，许多与花粉发育相关的基因和功能也相继被报道（Scott 等，2004；Wilson and Yang，2004；McCormick，2004）。Bedinger 等（2003）和 Germain 等（2005）先后报道了一类快速碱化因子基因，在花粉中特异表达，且与番茄、马铃薯的生殖发育、育性等有明显关联，表明在 RALF 家族中，可能存在一些专用于调控植物花粉发育的信号分子。

本实验室在对‘矮脚黄’普通白菜（*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis* Tsen et Lee cv. Aijiaohuang）小孢子发育的研究中，发现一个快速碱化因子类基因 *BcMF14*（GenBank 序列登录号：EF523516），并证实它在白菜两用系的可育株系中特异表达。RT-PCR 表达分析表明该基因在‘矮脚黄’白菜可育系花蕾的雄蕊部位专一表达，而在不育系的相应部位不表达。由于在 RALF 家族中，可能存在一些专一调控植物花粉发育的 RALF 信号分子，推测 *BcMF14* 很可能参与并调控白菜花粉发育的复杂过程。

菜心（*B. campestris* L. ssp. *chinensis* var. *parachinensis* Tsen et Lee）是一种生长周期短的芸薹属植物，适宜作为转基因的材料，本实验室已经建立了成熟的菜心遗传转化体系，并成功用于多种基因的转基因实验。为证明快速碱化因子基因可能参与调控植物的花粉发育过程，本研究从芸薹属的菜心中克隆出该类信号分子基因，对其序列特征和系统进化进行初步分析，为下一步在菜心中进行 *BcRALF* 转基因研究提供支持。

1　材料与方法

1.1　材料

以浙江大学蔬菜研究所细胞及分子生物学实验室保留的广东东莞白沙‘45 天油青’菜心为材料，并播于试验田，田间管理按常规进行。在苗龄 50 d 时，从群体中随机选取单株，每株取 2～3 片鲜嫩叶片，所选材料用 75％的酒精棉擦洗干净，做好记号，用纱布包好，立即投入液氮中固定，－75℃保存备用。

1.2　DNA 的提取及基因的克隆

模板 DNA 的提取及检测参照本实验室的方法并略加改进（曹家树等，1995）。在 *BcMF14* 编码框两侧设计引物 P1（5′ TAT GGG GAT GTC TGA AAG TAT C 3′）和 P2（5′ GTA AAA TTA ACC AAG GGT GGT G 3′），在菜心中扩增同源基因。PCR 反应总体积 25 μL，包括 DNA 模板（20 ng・μL^{-1}）1 μL，10× PCR 反应缓冲液 2.5 μL，dNTP（10 μmol・L^{-1}）0.5 μL，上下游引物（10 μmol・L^{-1}）各 0.5 μL，Taq 酶（5 U・μL^{-1}）0.5 μL，反应条件为 94℃预变性 2 min；94℃变性 30 s，56℃退火 30 s，72℃延伸 2 min，30 个循环；72℃延伸 10 min。

扩增产物用 1.0％的琼脂糖凝胶电泳检测其大小、纯度及亮度。对于扩增效果良好且足量的样品用 VITAGENE 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收，T_4 连接酶 4℃连接过夜，转入 DH5α 大肠杆菌中。挑取单个白色菌落，以碱裂解法抽提质粒，用 *Eco*RI 进行单酶切鉴定和 PCR 鉴定后，送上海博亚生物公司测序。

1.3　核酸序列及编码蛋白的特征分析

利用 DNAStar 软件对从菜心中得到的 *BcRALF* 基因的核苷酸序列进行分析，包括序列的开放阅读框的查找、氨基酸序列的翻译。预测蛋白质特征及蛋白序列结构分析通过蛋白质专家分析系统（http://ca.expasy.org）进行。

1.4　同源比对和系统树构建

将推测的 BcRALF 氨基酸序列在 GenBank 数据库用 blast 软件与网上的快速碱化因子蛋白序列进行比对，并将该基因编码的氨基酸序列用 Sequence Retrieval 系统在网上的 Swiss-Prot 蛋白数据库中进行同源比较，进一步找出该基因的生物信息，用 MEGA3.1 软件对 E value 为 0.01 的氨基酸进行序列分析，并用 NJ 法（Nighbour-joing）和 ME 法（Minimum Evolution）构建进化树，采用 BootStrap 1000 检验分子系统树各处的置信度。

2　结果与分析

2.1　*BcRALF* 基因的克隆

以菜心 DNA 为模板，用引物 P1、P2 进行 PCR 扩增反应，PCR 产物经电泳鉴定，得到一个大小为 280 bp 左右的特异性条带（图 1）。将该条带切胶回收，连接到 pGEM-T-easy-vector 载体上，转化 *E. coli* DH 5 α 感受态细胞，酶切检测后，将阳性克隆后送出测序。

2.2　*BcRALF* 序列特征分析

序列测定结果表明，*BcRALF* 的 DNA 序列由 280 个核苷酸组成（登陆号：GU086228）。利用 DNAStar 软件分析 *BcRALF* 最大开放阅读框



图 1　*BcRALF* 基因 PCR 扩增结果

1. 1 kb 核酸分子量标记；2. 以菜心 DNA 为模板扩增结果

Fig. 1　Amplication results of *BcRALF*

1. 1 kb DNA marker; 2. amplified product with *B. campestris chinensis* cv. *Parachinensis* DNA as template

为 240 个碱基，编码 79 个氨基酸（图 2），对 *BcRALF* 编码蛋白质的特征进行分析表明，该基因编码的氨基酸序列的分子量为 8.7481 kDa，等电点为 7.814，pH 7.0 时的电荷为 1.459；含有碱性氨基酸（K、R）9 个，酸性氨基酸（D、E）8 个，疏水氨基酸（A、I、L、F、W、V）23 个，极性氨基酸（N、C、Q、S、T、Y）23 个。通过 Prosite 数据库查询，发现 BcRALF 基因编码的蛋白包含有多个生物活性位点。包括一个 N-豆蔻酰化位点（2～7），两个蛋白激酶 C 磷酸化位点（6～8、51～53），一个酪氨酸激酶 II 磷酸化位点（24～27），和一个酪氨酸激酶磷酸化位点（53～60）。

2.3　*BcRALF* 同源比对和系统树构建

把 *BcRALF* 的 cDNA 在 GenBank 数据库用 blast 软件进行同源性搜索，结果表明与花椰菜的快速碱化因子（BoRALF1，登录号 DQ059310）、拟南芥 RALFL9（登录号 NM104838）的 mRNA 序列相似性很高，分别为 97%、85%。并且与拟南芥花和角果的一些 cDNA 序列的相似性也很高，由此初步推断该基因属于快速碱化因子类基因。进一步将该基因编码的氨基酸序列用 Sequence Retrieval 系统在网上的 Swiss-Prot 蛋白数据库比对，证实该基因是快速碱化因子类基因。

用 MEGA3.1 软件对 E value 为 0.01 的蛋白序列构建进化树，建树的蛋白序列来自花椰菜（蛋白序列号：Q4TTZ9）、拟南芥（Q3ECL0，Q8LBS8，Q1ECR9，Q8LBK5）、水稻（Q2QP50，Q7G716，Q10LK5）、白杨（Q84UC8）、高粱（Q6TF28）、茄属（Q5QJ47，Q945TO）。NJ 法和 ME 法构建的系统进化树结果一致，在此仅列出 NJ 法的树（图 3）。从进化树上可以看出快速碱化因子蛋白起源于共同的祖先，后来进化为不同的类别，基本上反映了这些物种进化的规律，主要的三个分支和传统分类学吻合。

3　讨论

BcRALF 与 GenBank 数据库中登录的多个 *RALF* 基因比较表明，它们的同源性很高，说明 *BcRALF* 是一个快速碱化因子类新基因。并且，

```
TATGGGGATGTCTGAAAGTATCAAGGTTGTTGTCTCTCTCTTTCTTGTGGTG
 M   G  M   S   E   S   I   K  V   V   V  S   L   F  L   V  V
TTATTGGCTCTTGCAGCAACCCAGACAGAGTCAAGATACATAAATTATCAT
 L   L   A   L   A   A   T   Q   T   E   S   R   Y   I   N   Y   H
GCCCTTCATGGAGATCACAGTTTAATTTGTGATAAAGCGCACCCAAACACC
 A   L   H   G   D   H   S   L   I   C   D   K   A   H   P   N   T
TGCAAGAAGGAAGAAGCCAATCCTTATACTAGAGGATGCGAGACAATCGAT
 C   K   K   E   E   A   N   P   Y   T   R   G   C   E   T   I   D
CGTTGTCGTGGTCAATCTCTAGGCCCAAAAATGTGAATCGACCAAGTAGAG
 R   C   R   G   Q   S   L   G   P   K   M
TACACCACCCTTGGTTAATTTTAC
```

图 2　*BcRALF* 的序列分析结果。起始和终止密码子加框表示，单下划线是 N-豆蔻酰化位点，双下划线是酪氨酸激酶磷酸化位点，阴影区是两个蛋白激酶 C 磷酸化位点，波浪线是酪氨酸激酶 II 磷酸化位点

Fig. 2　The structure analysis of *BcRALF*. Initiation and stop code are shown in framing. Underlined sequences is N-myristoylation site, double underlined is tyrosine kinase phosphorylation sit, shaded regions are 2 Protein kinase C phosphorylation site, wave line is casein kinase II phosphorylation site

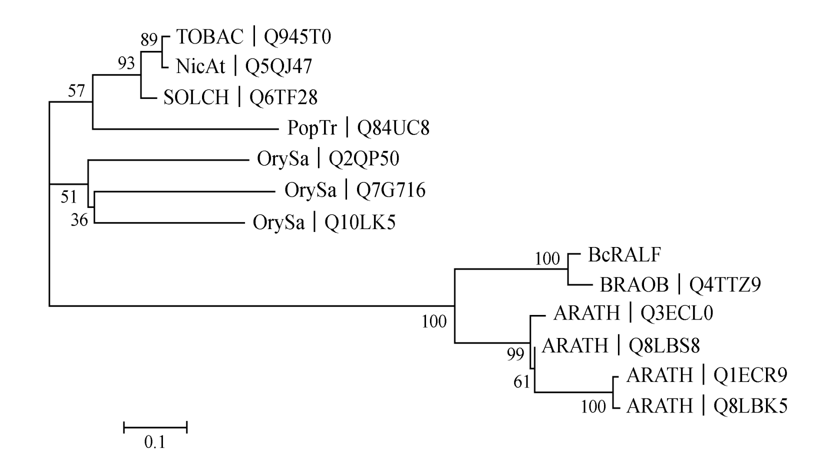


图3 基于推测的*BcRALF*编码蛋白的氨基酸序列构建的NJ系统进化树。图中数字为自举检验置信值（1 000个复制序列）

Fig. 3 Phyiogenetic tree based on putative BcRALF protein and other RALF proteins using NJ method. Numbers on the tree represented confidence values from bootstrap test (1 000 replicates)

和其它的RALF蛋白一样，推导的BcRALF蛋白有4个保守的半胱氨酸残基。*BcRALF*编码的蛋白包含有一个N-豆蔻酰化位点，两个蛋白激酶C磷酸化位点，一个酪氨酸激酶II磷酸化位点和一个酪氨酸激酶磷酸化位点。多个生物活性位点的存在说明作为信号分子，BcRALF蛋白的功能可能有多种。研究发现，在*RALF*基因家族中有一类参与植物生殖发育的调节过程（Germain等，2005；Bedinger等，2003；张国裕等，2006）。*BcRALF*与白菜的*BcMF14*基因的相似性极高（编码框内仅有1个核苷酸的差异），都属于快速碱化因子类基因。已证明*BcMF14*是白菜花粉发育中的相关基因，因此推测菜心中的*BcRALF*在花粉发育中必定起到关键作用，本实验室已在菜心中进行转基因试验，深入研究该基因的功能。

〔参 考 文 献〕

Bedinger P, Parsons R, Clark M *et al.*, 2003. PEX proteins, pollen specific LRX (Leucine-Rich Repeat Extensin Chimera) proteins [A]. In: Proceedings of the 7th International Congress on Plant Molecular Biology [C]. Barcelona, Spain, S20—S69

Cao JS (曹家树), Cao SC (曹寿椿), Yi QM (易清明), 1995. RAPD analysis on genomic DNA of Chinese cabbage and the other groups of *Brassica* [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), **22**: 47—52

Franssen HJ, Bisseling T, 2001. Peptide signaling in plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98** (23): 12855—12856

Germain H, Chevalier E, Caron S *et al.*, 2005. Characterization of five RALF-like genes from *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants [J]. *Planta*, **220** (3), 447—454

Matsubayashi Y, Yang H, Sakagami Y, 2001. Peptide signals and their receptors in higher plants [J]. *Trends in Plant Science*, **6** (12): 573—577

McCormick S, 2004. Control of male gametophyte development [J]. *The Plant Cell*, **16** (Supp l): 142—153

Pearce G, Moura DS, Stratmann J *et al.*, 2001. RALF, a 5 kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98** (22): 12843—12847

Ryan CA, Pearce G, 2001. Polypeptide hormones [J]. *Plant Physiology*, **125** (1): 65—68

Ryan CA, Pearce G, 2003. Systemins: A functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **25** (100): 14577—14580

Scott RJ, Spielman M, Dickinson HG, 2004. Stamen structure and function [J]. *The Plant Cell*, **16** (Supp l): 46—60

Wilson ZA, Yang C, 2004. Plant gametogenesis: conservation and contrasts in development [J]. *Reproduction*, **128**: 483—492

Yang H, Matsubayashi Y, Hanai H *et al.*, 2000. Molecular cloning and characterization of OsPSK, a gene encoding a precursor for phytosulfokine-α, required for rice cell proliferation [J]. *Plant Molecular Biology*, **44** (5): 635—647

Zhang GY (张国裕), Kang JG (康俊根), Zhang YG (张延国) *et al.*, 2006. Cloning and sequence analyzing of a gene (RALF) from broccoli [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), **33** (3): 561—565